med. 242

Hamburg 1962

G. Funke

Aus der Universitäts-Frauenklinik Hamburg-Eppendorf
Direktor: Professor Dr. G. Schubert

MUTATIONSAUSLÖSUNG BEI DROSOPHILA DURCH ALLEINIGE UND KOMBINIERTE ANWENDUNG VON RÖNTGENSTRAHLEN SOWIE DEM CYTOSTATICUM 2,5-BISAETHYLENIMINOBENZOCHINON-1,4

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von
Gerhild Funke
aus Neuhaus /Solling

Hamburg 1962

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg
am: 8. 11. 1962

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Dekan:	Professor Dr. Dr. N. Jansen
Referent:	Priv.-Doz. Dr. G. Höhne
Korreferent:	Professor Dr. G. Schubert

Inhaltsverzeichnis

1.) Einleitung und Fragestellung

2.) Methodik:

a) Beschreibung des Cytostaticums 2,5-Bisäthyleniminobenzochinon-1,4

b) Methode des Mutagenitätsnachweises

c) Versuchstechnik

3.) Ergebnisse

4.) Diskussion der Ergebnisse

5.) Zusammenfassung

6.) Literaturverzeichnis

7.) Lebenslauf

Einleitung

Wie bekannt, sind die erbtragenden Strukturen jeder Zelle - die Chromosome mit den Genen - vergleichsweise sehr stabile biologische Systeme. Allerdings kommen Änderungen der Erbsubstanz, des genetischen Substrats, bei allen pflanzlichen und tierischen Organismen vor. Solche sprunghaft auftretende Erbänderungen bezeichnet man als Mutationen. Einesteils treten sie spontan, d. h. ohne erkennbare Ursache, mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit auf, so daß man für viele Erbänderungen und Organismen eine natürliche Mutationsrate angeben kann. Andererseits lassen sie sich durch eine Reihe verschiedener physikalischer und chemischer Noxen "künstlich" auslösen. Zu den bekannten mutagenen Noxen gehören alle ionisierenden Strahlen, extreme Temperatureinflüsse (Temperaturschocks) und eine ganze Anzahl sehr verschiedenartiger chemischer Substanzen.

Mutationen sind demnach autochthone oder induzierte Änderungen der Erbstruktur, die praktisch irreversibel sind und sowohl in Keimzellen als auch in allen Somazellen auftreten können. Mutationsvorgänge in den Keimzellen eines Organismus sind immer von besonderer Konsequenz, da ihre Auswirkungen hier nicht auf das betroffene Individuum beschränkt bleiben, sondern auf die folgenden Generationen übertragen, also vererbt werden. Ganz generell läßt sich auch sagen, daß die meisten Mutationen der Keimzellen stets die Lebensfähigkeit der daraus hervorgehenden Individuen mehr oder weniger beeinträchtigen oder sogar so stark herabsetzen, daß es zu einem Absterben solcher "Mutanten" vor Erreichung der Fortpflanzungsfähigkeit kommt (Letalfaktoren).

Als erstem gelang es MULLER 1927, Mutationen in großer Anzahl künstlich durch Röntgenbestrahlung der Keimdrüsen der Taufliege Drosophila melanogaster auszulösen. Mit einer Maximaldosis von 10 000 - 12 000 r ließ sich hier die Mutationsrate für rezessive Letalfaktoren des X-Chromosoms, die normalerweise in der Größenordnung einiger Promille liegt, bis über 30 % steigern. Dabei zeigte sich ferner das wichtige Ergebnis, daß die Mutationsauslösung praktisch unabhängig von der zeitlichen Verteilung (Protrahierung, Fraktionierung) einer applizierten Gesamtstrahlendosis ist, und daß die Mutationsrate etwa proportional mit ansteigender Strahlendosis ansteigt. Es gibt also offensichtlich bei der Strahleninduktion von sog. Punktmutationen keine für die Auslösung solcher Mutationen unterschwellige

Röntgenstrahlendosis. In späteren Arbeiten wurde gezeigt, daß auch alle anderen ionisierenden Strahlenarten (z. B. Gamma-Strahlen, Beta-Strahlen, Neutronen) mutagen wirken.

Seit etwa 15 Jahren hat die mutationsgenetische Forschung im Tierexperiment und bei pflanzlichen Objekten immer wieder zeigen können, daß sich Erbänderungen auch durch gewisse Chemikalien auslösen lassen. Eingeleitet wurde die Ära der modernen Chemogenetik durch die überraschenden Ergebnisse von OEHLKERS (1943) an urethanbehandelten Pflanzen (Oenothera) und von AUERBACH und ROBSON (1944), die Taufliegen mit dem chemischen Kampfstoff Senfgas behandelt hatten. Auerbach und Robson konnten z. B. durch Applikation von S-Lost bis zu 25 % der behandelten Spermien (X-Chromosome) mit rezessiven Letalfaktoren belasten. M. Vogt konnte später die Mutagenität von Urethan auch bei Drosophila eindeutig nachweisen. Sie erzielte eine Mutationsrate von 6 % für rezessive Letalfaktoren des X-Chromosoms.

Das Vorkommen chemischer Mutagene ist nicht nur theoretisch bedeutungsvoll, sondern auch deshalb von besonderer Wichtigkeit, weil es sich bei der Mehrzahl der bekannten chemischen Noxen vornehmlich um tumortherapeutisch wirksame Substanzen handelt, die zum Teil bereits in der humanmedizinischen Praxis angewandt werden.

Die auffälligste biologische Wirksamkeit dieser Stoffe besteht darin, daß sie eine Schädigung des Ruhekerns der Zelle hervorrufen, somit die Zellteilung blockieren, so daß es zum Sistieren der Zellvermehrung und zur Hemmung der Wachstumsvorgänge kommt. Man bezeichnet derartig wirksame chemische Stoffe als Cytostatica. Die cytostatische Wirkung, verbunden mit dem mutagenen Effekt, ist gleichermaßen jedoch auch allen ionisierenden Strahlen eigen. Urethan, die verschiedenen Lostderivate sowie analog wirksame Verbindungen wie z. B. Triäthylenmelamin, Diepoxyde oder verschiedene Äthyleniminobenzochinonverbindungen können somit mit Berechtigung als "radiomimetische" Gifte bezeichnet werden. Allerdings kann nicht für alle bisher bekannten mutagenen chemischen Substanzen eine strenge Beziehung zwischen cytostatischer Wirkung und Mutationsauslösung nachgewiesen werden. Offensichtlich sind die beiden Wirkungsqualitäten nicht zwangsläufig an eine gemeinsame spezifische chemische Struktur gebunden. Aus diesem Grunde erscheint es unmöglich, vom chemischen

Aufbau allein Rückschlüsse auf die mutagene bzw. cytostatische Wirkung einer Substanz zu ziehen.

Die Tatsache des Vorkommens chemischer mutationsauslösender Substanzen in der Umwelt des Menschen erlangt unter humangenetischem Aspekt eine erhebliche praktische Bedeutung, da immer mehr cytostatisch und mutagen wirksame Substanzen zur Behandlung der verschiedensten bösartigen Erkrankungen des Menschen herangezogen werden. Von den obengenannten Verbindungen werden besonders das Urethan, verschiedene N-Lostderivate und neuerdings auch verschiedene cytostatisch wirksame Substanzen aus der Reihe des Bisäthyleniminobenzochinons in der klinischen Medizin angewendet. In allen solchen Fällen kann die potentiell erhebliche genetische Wirkung dieser Medikamente nicht unbeachtet bleiben, zumindest bei jungen Patienten, bei denen nach einer cytostatischen Behandlung eine Fortpflanzung noch wahrscheinlich oder möglich ist. Hier würde der in seinem Ausmaß kaum abzuschätzende, aber immer vorhandene Mutationseffekt eine zusätzliche Beeinträchtigung des menschlichen Erbgutes bedingen. Die ohnehin schon unabwendbare mutagene Beeinflussung des menschlichen Erbsubstrats durch die Umweltstrahlung, die ständig steigende Strahlenanwendung sowie neuerdings durch die vielfältige Anwendung der Atomenergie müßte eine weitere Steigerung erfahren.

Bereits 1955 wies deshalb LÜERS daraufhin, daß die chemische Erbschädigung durch mutagene Medikamente nur durch eine strenge und überlegte medizinische Anwendung und durch entsprechende Aufklärung der Patienten in Grenzen gehalten werden kann. Die bisherigen Befunde der Chemogenetik erlauben natürlich noch keine Beantwortung der Frage, welche der mutagenen Chemikalien im menschlichen Körper eine hinreichende Konzentration an den Gonaden erreichen, um Mutationen auszulösen. Dazu fehlen noch mannigfache Voraussetzungen. Aber selbst wenn man von einer Abschätzung des genetischen Risikos durch die in Frage kommenden Chemikalien beim Menschen absieht, so kann zumindest prinzipiell an dem Vorhandensein einer Mutationsbelastung auf diesem Wege kein Zweifel sein.

In experimenteller Hinsicht ist die mutagene Wirkung der ionisierenden Strahlen sowie verschiedener Chemikalien vom Typ der Cytostatica oder radiomimetischen Substanzen bereits sehr weitgehend untersucht worden. Da derartige erbschädigende Noxen sicher häufig kombiniert oder gleich-

zeitig am Erbsubstrat wirksam werden, ist die Frage berechtigt, ob Wechselwirkungen zwischen diesen Mutagenen denkbar sind, die zu einer Steigerung oder Herabminderung des Mutationseffektes führen, oder ob bei kombinierter Anwendung verschiedenartiger Mutagene lediglich eine Summation der Einzeleffekte zu erwarten ist. Über mögliche Wechselwirkungen bei einer kombinierten Anwendung von ionisierender Strahlung und chemischen Mutagenen ist bislang nur sehr wenig bekannt. Ihre Kenntnis verspricht jedoch nicht nur weitere Aufschlüsse über die Natur des strahlen- bzw. chemoinduzierten Mutationsgeschehens; sie gewinnt auch gerade im Hinblick auf die Anwendung ionisierender Strahlen und der Cytostatica beim Menschen eine große praktische Bedeutung.

Im folgenden wird nun über experimentelle Untersuchungen an der Taufliege Drosophila berichtet, in denen die mutationsauslösende Wirkung einer therapieüblichen Röntgenstrahlung und eines sehr wirksamen Cytostaticums - eines Bisäthyleniminobenzochinon-Derivats ("Bayer E 39 solubile") - allein und vor allem bei kombinierter Anwendung überprüft wurde. LÜERS sowie SCHUBERT, BERTRAM und HÖHNE konnten bereits in früheren kreuzungsanalytischen Untersuchungen bei Drosophila zeigen, daß das obige Cytostaticum ein recht starkes chemisches Mutagen darstellt.

Methodik

a) Das Cytostaticum "Bayer E 39"

Zu den neueren chemischen Substanzen, die nach experimentellen Befunden eine gute cytostatische Wirkung entfalten, gehören vor allem verschiedene Derivate des von PETERSEN und GAUSS entwickelten Äthyleniminobenzochinons. Unter der Bezeichnung Bayer E 39 solubile ist chemisch das 2,5 - Bis-methoxy-äthoxy- 3,6 - bis-äthylenimino-benzochinon - 1,4 zu verstehen. Diese Verbindung ist aus dem kaum wasserlöslichen E 39 (2,5 - Bis-n-propoxy-3,6 - bis-äthylenimino-benzochinon-1,4) durch Abwandlung der Struktur in den Seitenketten hervorgegangen und besitzt

damit den Vorteil vollständiger Wasserlöslichkeit. Die aus hellziegelroten verfilzten Nädelchen bestehende Trockensubstanz wird am zweckmäßigsten in physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst und so zur intravenösen oder lokalen Anwendung gebracht. Die toxikologische Prüfung durch Experimente am Kaninchen ergab, daß wiederholte i. v. Gaben von Bayer E 39 zu erheblichen Knochenmarkstörungen als Zeichen einer starken cytostatischen Wirkung führen, wobei der Grad der Schädigung allerdings von der Höhe der verabreichten Dosis abhängig ist. Tagesdosen bis 0,4 mg/kg konnten ohne Störung längere Zeit hindurch injiziert werden, während es bei Tagesdosen, die 0,4 mg/kg übersteigen, sehr bald zu Leukozytenstürzen und zum Tod der Versuchstiere kam.

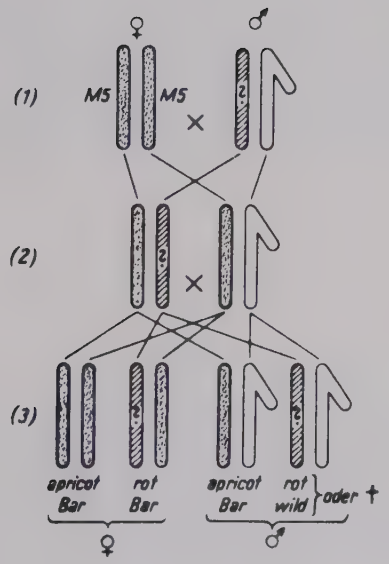
Die zellteilungshemmende Wirksamkeit des Bayer E 39 ist besonders von DOMAGK, PETERSEN und GAUSS ausführlich studiert worden. So zeigten z. B. histologische Untersuchungen verschiedener Tiertumoren, die einer Behandlung mit E 39 ausgesetzt waren, erhebliche Störungen der Mitosevorgänge, eine Verzögerung der Kerndurchschnürung und verschiedene Chromosomenaberrationen, wie z. B. Chromosomenverklumpung und Chromosomenfragmentierung. Neben einer Kernwirkung sind aber auch morphologische Veränderungen des Cytoplasmas beschrieben worden. Nach biochemischen Untersuchungen von HOLZER und MITARB. an Tumorgewebe, greifen Cytostatica dieses Typs hemmend in den gesteigerten Gärungsstoffwechsel bösartiger Geschwülste durch Blockierung bestimmter Fermentsysteme ein. Hinsichtlich der uns besonders interessierenden Mutagenität fanden HENKE, HÖHNE und KÜNKEL bei Drosophila eine deutliche mutationssteigernde Wirkung der obengenannten cytostatischen Verbindung nach intraabdomineller Injektion subtoxischer Dosen an Imagines. LÜERS erhielt nach Verfütterung von E 39 an männliche Drosophila-Imagines sogar noch eine wesentlich höhere Mutationssteigerung. Nach diesen Befunden kann kein Zweifel sein, daß die Äthyleniminobenzochinone - wie viele andere Cytostatica vom Typ der radiomimetischen Substanzen - zu den stark wirksamen Mutagenen gehören.

b) Methode des Mutationsnachweises

Viele Mutationen, insbesondere Punktmutationen, lassen sich sehr einfach kreuzungsanalytisch erfassen. Eine besonders einfache und sichere Nachweistechnik existiert vor allem für die sog. geschlechtsgekoppelten rezessiven Letalfaktoren bei der Taufliege Drosophila. Solche Letalfaktoren sind leicht zu erkennen, weil derartige im X-Chromosom lokalisierte Erbänderungen zu einem drastisch veränderten Geschlechtsverhältnis in der nachfolgenden Generation führen müssen. Erbliche Letalfaktoren sind Mutationen, die sowohl spontan als auch nach Einwirkung mutagener Noxen relativ häufig auftreten und sich im Erbgang wie gewöhnliche Punktmutationen verhalten. Sie bewirken stets den Tod des sie enthaltenden Individuums vor Erreichen seines fortpflanzungsfähigen Stadiums. Zum Teil beruhen solche Erbänderungen auf sichtbaren Veränderungen der genischen Substanz: ein hoher Prozentsatz von ihnen ist zurückzuführen auf den Verlust von Chromosomenstücken (Deficiencies); andere werden durch Duplikationen bewirkt, wieder andere treten bei kleinen Translokationen oder Inversionen des Chromosomengefüges auf. Der Anteil wirklicher Punktmutationen unter den Letalfaktoren ist offenbar gering und läßt sich nicht benau bestimmen (HADORN).

Zum Nachweis von geschlechtsgebundenen Letalfaktoren bei Drosophila benutzten wir die zuerst von MULLER entwickelte Basc-Technik (Muller-5-Technik).

Diese Methode geht im Prinzip davon aus, daß 50 % der Söhne letal werden, falls die Mutter in einem X-Chromosom einen Letalfaktor führt. Das Verhältnis von Weibchen zu Männchen wäre dann bei den Nachkommen 2 : 1, statt - wie im Normalfall - 1 : 1. Um die zeitraubende Auszählung der Geschlechter zu vermeiden und eine sichere Erfassung aller auftretenden derartigen Mutationen zu gewährleisten, bedient man sich besonders markierter und konstruierter Test-Stämme - im vorliegenden Fall des Muller-5-Stamms. Das sog. Muller-5-Chromosom besitzt neben zwei Inversionen, die einen Austausch von Genen innerhalb der X-Chromosome praktisch vollständig verhindern, die Markierungsgene white-apricot = w^a und Bar = B, Eigenschaften, die sich auf Farbe und Form der Augen beziehen. Aus dem Vererbungsschema (Abb. 1) geht ohne weiteres hervor, daß es wesent-



Schema der Muller-5-Technik

lich ist, daß in der ersten Filialgeneration nur eine Klasse von Weibchen entsteht, die neben dem Muller-5-Chromosom mit den obengenannten Markierungsgenen das väterliche Testchromosom enthält. Das wird erreicht, indem man Männchen eines Wildstammes mit den auf dem X-Chromosom lokalisierten Augenmerkmalen "rot" u. "rund" dem zu prüfenden Agens aussetzt und mit virginellen M-5-Weibchen zur Paarung bringt. Bei einer Weiterkreuzung der F_1-Tiere miteinander ergibt sich dann eine F_2-Generation, bei der neben zwei Klassen von weiblichen Zygoten auch zweierlei Klassen von männlichen Zygoten entstehen, nämlich einerseits die vitalen M-5-Männchen mit hellaprikosenfarbigen (w^a) und bandförmigen (B) Augen, andererseits Männchen mit dem zu prüfenden Wild-X-Chromosom, die normale rote und runde Augen besitzen. Enthält dieses Testchromosom jedoch einen in der P-Generation neu entstandenen Letalfaktor, so kommen diese Männchen nicht zur Entwicklung; sie erreichen nicht das Imaginalstadium. Ein Fehlen dieser Männchen in der F_2-Generation zeigt also mit Sicherheit eine stattgehabte letal wirkende Mutation in dem großväterlichen, der Behandlung ausgesetzten X-Chromosom, an.

c) Versuchstechnik

Die Zucht der Taufliegen erfolgte in Einzelkulturen, und zwar in Zylindergläsern mit einem Durchmesser von 4 cm und einer Höhe von 9 cm. Als Nährboden diente ein Wasserbrei aus Weizengrieß und Zuckerrübensirup, dem zur Verhinderung von Schimmelbildung Nipagin (1 g/1 Ltr. Brei) zugesetzt wurde. Dieser Nährbrei wurde in einer etwa 1-2 cm hohen Schicht in die Gläser eingebracht und nach Erkalten oberflächlich mit einer Aufschwemmung von Backhefe versetzt.

Die Applikation einer chemischen Substanz, die auf ihre mutagene Wirkung geprüft werden soll, sollte so erfolgen, daß das Mittel mit einiger Sicherheit in genügender Konzentration an das Testobjekt, in unserem Falle die Gonaden der Fliegen, gelangt. In der Drosophila-Genetik sind in dieser Hinsicht verschiedene Applikationsmöglichkeiten wie

Einbringen von Eiern in eine Lösung,
Aerosolinhalation,
Implantation von Kristallen in die Bauchhöhle,
Fütterung der Larven oder Imagines,
Exstirpation der Larven-Gonaden mit Behandlung in vitro und Implantation derselben in gleichalte Tiere sowie die Injektion in das Abdomen erwachsener Tiere

mit mehr oder weniger Erfolg angewendet worden. Wir wählten die intraabdominelle Injektion, da sie bei wasserlöslichen Substanzen nach umfangreichen experimentellen Erfahrungen den Vorzug relativer Zuverlässigkeit, selbst bei Stoffen mit schwacher Mutagenität, besitzt. Die Konzentration am Wirkungsort dürfte bei dieser Form der Applikation am höchsten sein, und durch Umgehung eines längeren Transportes im Organismus kann auch am ehesten eine chemische Veränderung des Mittels (z. B. Entgiftung) vermieden werden. Diese Methode erwies sich bei M. VOGT, die sie zuerst bei der Testung des Äthylurethan an Drosophila erprobte, als relativ sicher; auch andere Autoren (SCHUBERT und MITARB., FAHMY, AUERBACH u. a.) erzielten bei der Testung cytostatischer Substanzen gute Erfolge damit.

Als Vorbereitung zur Injektion wurden stets drei Tage alte Wildstamm-Männchen ("Berlin-normal") mit Äther narkotisiert und in Rückenlage mittels eines schmalen Papierstreifens auf einer Wachsplatte gut fixiert. Die Injektion in das Abdomen erfolgte mit einer fein ausgezogenen Kapillarpipette entsprechend der Methode von VOGT zwischen zwei Chitinringen. Es wurde eine 0,001%ige Lösung von Bayer E 39 solubile in 0,75%iger fliegenisotonischer NaCL-Lösung, die einer vorher erprobten subletalen Dosis entsprach, verwendet. Die injizierte Menge betrug im Durchschnitt etwa 0,02 - 0,05 cmm.

Für die Röntgenbestrahlung wurde ein 200 kV-Therapiegerät (Müller RT 200) benutzt. In den Bestrahlungsserien wurde den - je nach Versuchsanordnung unbehandelten oder vorher mit Bayer E 39 behandelten - Männchen, die sich in einem luftdurchlässigen Zellophanbehälter befanden, jeweils Dosen von 0,5 kr verabfolgt.

Neben der Feststellung der spontan auftretenden Letalfaktorenrate sowie der Bestimmung der Mutationsraten nach Einwirkung von 0,5 kr Röntgen-

strahlen bzw. nach Applikation von Bisäthyleniminobenzochinon in der oben angegebenen Form kamen zwei weitere Untersuchungsreihen zur Durchführung, in welchen der kombinierte Einfluß von Röntgenstrahlung und Bisäthyleniminobenzochinon überprüft wurde. In der ersten Reihe wurden 3 Tage alte Männchen vom Wildstamm Berlin-normal mit o,5 kr Röntgenstrahlung bestrahlt und nach einem Intervall von einer Stunde die Injektion des Cytostaticums vorgenommen. In der zweiten Reihe dagegen wurde umgekehrt den 3 Tage alten BN-Männchen zuerst das Cytostaticum appliziert und nach einer Stunde die Bestrahlung durchgeführt..

Die behandelten Männchen der verschiedenen Versuchsreihen wurden stets 24 Stunden später einzeln mit je 2 virginellen M5-Weibchen zur Paarung gebracht, um eine möglichst große Anzahl von Spermien testen zu können. Die Tiere der F_1-Generation wurden paarweise zur F_2-Generation weitergezüchtet.

Ergebnisse

a) Toxizität des Cytostaticums

Die relativ hohe Allgemeintoxizität des Cytostaticums 2,5-Bisäthyleniminobenzochinon - 1,4, die sich auch bei der klinischen Anwendung zeigt, läßt sich deutlich an der Zahl der nach 12 Stunden nach intraabdomineller Injektion noch überlebender Fliegen aufweisen (Tab. 1). Während nach einer Injektion von fliegenphysiologischer NaCl-Lösung nach früheren umfangreichen Erfahrungen stets eine Überlebensrate von mehr als 90 % resultiert, wirken Injektionen gleichgroßer Lösungsmengen des Cytostaticums in einer Konzentration zwischen 5 und 0,25 % immer voll letal. Erst bei viel niedrigeren Konzentrationen - zwischen 0,1 und 0,001 % - kommt man in einen Dosisbereich, der wegen der geringen Allgemeintoxität für experimentelle Zwecke geeignet erscheint, andererseits aber dennoch eine genügend hohe Mutationsausbeute liefert.

Konzentration der injizierten Lösung in %	Zahl der behandelten Tiere	Überlebende	Überlebende in %
5,0	20	0	0
2,5	20	0	0
1,0	20	0	0
0,5	20	0	0
0,25	20	0	0
0,1	45	16	36
0,01	38	36	95
0,001	35	32	92

Tab. 1: Toxizität von 2,5-Bisäthyleniminobenzochinon-1,4 bei Injektion (intraabdominal) an männliche Drosophila-Imagines.

b) Spontanmutabilität beim Wildstamm Berlin normal

Zur Ermittlung der spontan, d. h. ohne erkennbare äußere Ursache entstehenden Letalmutationen wurde zuerst an unbehandelten Männchen in insgesamt 9 Versuchsreihen der Muller-5-Test durchgeführt. Dabei fanden sich unter 1328 geprüften Spermien 6 Letalfaktoren, entsprechend einer Rate von 0,45 %.

Diese in reifen Drosophila-Spermien festgestellte Spontanrate entspricht damit in der Größenordnung den in früheren Untersuchungen am gleichen Wildstamm gefundenen Werten zwischen 0,1 und 0,4 % und den bei anderen Drosophila-Wildstämmen beobachteten von 0,07 bis 0,7 % schwankenden Durchschnittswerten. Diese vergleichsweise hohe Spontanfrequenz für rezessive Letalfaktoren gilt jedoch nur für solche, die im Geschlechtschromosom lokalisiert sind.

c) Mutationsauslösung durch Röntgenstrahlen und nach Anwendung des Cytostaticums

Die mutagene Wirkung der Röntgenstrahlen und des 2,5-Bisäthyleniminobenzochinons-1,4 wurde jeweils in einigen Versuchsreihen geprüft, wobei insgesamt eine annähernd gleich große Zahl von Spermien zur Auswertung kam. Die Ergebnisse sind in der Tab. 2 zusammengestellt worden.

Wie aus der Tabelle hervorgeht, erhielten wir nach einer Röntgenbestrahlung mit einer Dosis von 0,5 kr eine Letalfaktorrate von 1,93 %. Dies bedeutet eine Steigerung der Spontanrate um das 4,3fache. Dieser Wert liegt im Vergleich zu anderen Autoren, die mit gleicher Dosis ebenfalls im wesentlichen reife Keimzellen bestrahlten, etwas hoch; er stimmt jedoch auch annähernd mit manchen früheren strahlengenetischen Befunden überein.

Das 2,5-Bisäthyleniminobenzochinon-1,4 in Form seines wasserlöslichen Derivates entfaltet ebenfalls eine erhebliche mutagene Wirkung. Bei Anwendung einer 0,001%igen Lösung fand sich eine Letalmutationsrate von 2,14 %, entsprechend einer Steigerung der Spontanmutabilität auf das 4,7fache. Damit ist die starke erbgutschädigende Wirkung des Cytostaticums erneut einwandfrei aufgezeigt. In früheren Untersuchungen haben BERTRAM, HÖHNE und SCHUBERT bei Anwendung stärker konzentrierter Lösungen in Einzelversuchen Mutationsraten bis zu 5,6 % gefunden.

Insgesamt läßt sich somit feststellen, daß unter den vorliegenden Versuchsbedingungen durch intraabdominelle Injektion des Cytostaticums 2,5-Bisäthyleniminobenzochinon-1,4 und durch eine Röntgenbestrahlung mit einer Dosis von 0,5 kr eine eindeutige und etwa gleich hohe Mutationsbelastung hervorgerufen worden ist.

Behandlung	Zahl der geprüften X-Chromosome	Zahl der Letalfaktoren	Mutationsrate in %
Röntgenstrahlen (500 r)	1766	34	1,93
Bisäthylenimino-benzochinon (0,001 %)	1918	41	2,14

Tab. 2 Mutationsauslösung bei Drosophila durch alleinige Anwendung von Röntgenstrahlen bzw. von 2,5-Bisäthyleniminobenzochinon-1,4

d) Mutationsauslösung durch kombinierte Anwendung von Röntgenstrahlen und Cytostaticum

In den folgenden Versuchsreihen wurde nun die kombinierte Anwendung von Röntgenstrahlen und dem chemischen Mutagen überprüft. Hierbei wurde experimentell in genau der gleichen Weise wie bei den voranstehenden Untersuchungen vorgegangen. Zwischen der Erst- und Zweitbehandlung lag jeweils ein Zeitraum von 15 bis 30 Minuten. In einer ersten Serie wurde die Mutationsauslösung nach Injektion des Cytostaticums und anschließender Röntgenbestrahlung festgestellt; in einer zweiten Serie erfolgte zuerst die Röntgenbestrahlung und darauffolgend die chemische Behandlung. Die Zahl der zur Auswertung kommenden Spermien wurde in beiden Versuchsgruppen annähernd gleich groß gestaltet. Die Ergebnisse beider Serien enthält zusammenfassend die Tab. 3.

Es zeigt sich, daß im ersten Falle - also bei Injektion des Cytostaticums und darauffolgender Bestrahlung mit 0,5 kr eine Mutationsrate zustande kommt, die mit 4,85 % etwas mehr als die Summe der nach alleiniger Röntgenbestrahlung bzw. alleiniger Cytostaticaanwendung ermittelten Mutationswerte beträgt. Im Rahmen der Fehlergrenze der Einzelversuche darf man sicher annehmen, daß es hier zu einer Addition der röntgen- bzw. chemoinduzierten Mutationsraten gekommen ist.

Im zweiten Falle dagegen - also bei Röntgenbestrahlung und darauffolgender Applikation des Cytostaticums - ergibt sich ein ganz anderes Resultat. Hier beläuft sich die Mutationsrate nach Kombinationsbehandlung auf nur 2,49 %. Sie entspricht mit diesem Wert damit etwa den jeweiligen Einzelwerten nach Röntgenbestrahlung oder nach Cytostaticaanwendung. Eine Additivität der Einzelwirkungen fehlt; sie ist im Rahmen der Streubreite der Werte auch nicht andeutungsweise erkennbar.

Behandlung	Zahl der geprüften Chromosome	Zahl der Letalfaktoren	Mutationsrate in %
1. Bisäthylen-iminobenzo-chinon 0,001 %) + 2. Röntgen-strahlen (500 r)	1683	82	4,85
1. Röntgen-strahlen (500 r) + 2. Bisäthylen-iminobenzo-chinon (0,001 %)	1842	46	2,49

Tab. 3. Mutationsauslösung bei Drosophila durch kombinierte Anwendung von Röntgenstrahlen und 2,5-Bisäthyleniminobenzochinon-1,4.

Diskussion

Aus den vorstehend beschriebenen Ergebnissen geht zunächst hervor, daß das wasserlösliche Derivat des Cytostaticums 2,5-Bisäthyleniminobenzochinon-1,4 eine erhebliche Mutagenität aufweist, die im Letalfaktortest quantitativ der mutationsauslösenden Wirksamkeit anderer bekannter cytostatischer Stoffe entspricht. Wie z. B. verschiedene geprüfte S-Lost- und N-Lost-Derivate, Triäthylenmelamin, Diepoxybutan oder eine Reihe anderer alkylierender Substanzen gehört das obige Cytostaticum zu den stark wirksamen chemischen Mutagenen. Das Ausmaß der chemoinduzierten Mutationsrate hängt dabei entschieden von der Wasserlöslichkeit der Substanzen ab. Im Gegensatz zu dem hier beschriebenen Befund und den zitierten Ergebnissen von BERTRAM konnte RUNGE z. B. bei gleichartiger Anwendung des unveresterten, sehr schlecht wasserlöslichen, reinen Bisäthyleniminobenzochinons bei Drosophila nur eine schwache Mutagenität nachweisen.

Die durch das Cytostaticum unter obigen Bedingungen ausgelöste Mutationsrate liegt geringfügig höher als diejenige, die nach einer üblichen Röntgenbestrahlung mit einer Dosis von 500 r erhalten wurde. Nach früheren umfangreichen Befunden kann gelten, daß mit einer Dosis von 0,5 kr Röntgenstrahlen durchschnittlich etwa 1,4 bis 1,5 % Letalmutationen im X-Chromosom induziert werden. Unser obiger Wert von 1,93 % liegt daran gemessen relativ hoch. Derartige Variationen können jedoch leicht zustandekommen durch eine unterschiedliche Alterszusammensetzung der jeweilig geprüften "reifen" Spermienkollektive. Insbesondere zahlreiche neuere Untersuchungen von AUERBACH haben gezeigt, wie stark die Strahlenempfindlichkeit des Erbgutes in Drosophila-Spermien in Abhängigkeit vom Reifungszustand variiert. Unter den von uns gewählten Bedingungen (Kopulationsmöglichkeit über 3 Tage) ist sicherlich hinsichtlich der Alterszusammensetzung der Spermien und damit auch hinsichtlich ihrer Strahlenempfindlichkeit mit einer relativ großen Heterogenität zu rechnen.

Über die Auswirkungen einer kombinierten Anwendung von mutagenen Chemikalien und mutagenen Strahlen auf das Erbgut liegen vorerst nur spärliche Erfahrungen vor. Mögliche Wechselwirkungen zwischen ver-

schiedenartigen mutationsauslösenden, also erbgutschädigenden Faktoren haben aber zweifellos nicht nur eine theoretische Bedeutung, sondern können auch - auf die Humangenetik bezogen - von ganz erheblicher praktischer Wichtigkeit sein. Die immer größer werdende Zahl von mutagenen Noxen, die heute in der engeren oder weiteren Umwelt des Menschen vorkommen, läßt hinsichtlich der Erbgutschädigung zweifellos einen neuen und bislang noch wenig beachteten Gefahrenpunkt erstehen. Auf diesen wichtigen, noch weitgehend ungeklärten Sachverhalt machen besonders MARQUARDT und SCHUBERT in ihrer Monographie "Die Strahlengefährdung des Menschen durch Atomenergie" (Rowohlt-Verlag Hamburg 1959) aufmerksam.

Zuerst hat wohl AUERBACH bei Drosophilafliegen die kombinierte Einwirkung einer Senfgasbehandlung und einer - einen Tag später erfolgenden - Röntgenbestrahlung näher untersucht. Hier ließ sich offensichtlich eine einfache Summation der beiden mutagenen Wirkungen bezüglich der untersuchten Letalmutationen feststellen. In allerjüngster Zeit hat dann OSTER ähnliche ausgiebigere Untersuchungen angestellt, indem er Röntgenstrahlen und Senfgas bzw. Äthylurethan kombinierte. Auch in diesem Fall ergab sich eine Additivität der Einzelwirkungen, unabhängig von der Reihenfolge der Einwirkung der Noxen. Zusammenfassend kann man aus den vorliegenden Befunden schließen, daß sich die geprüften verschiedenen Noxen nicht in positivem oder negativem Sinne in ihrer Wirkung beeinflussen, sondern daß die jeweils induzierten Mutationsprozesse wohl gleichartig oder unabhängig voneinander sind.

In unseren Kombinationsversuchen läßt sich im ersten Falle - also bei chemischer Behandlung mit anschließender Röntgenbestrahlung - ebenfalls eine reine Additivität der einzelnen Mutationseffekte nachweisen: Die Mutationsrate nach kombinierter Behandlung entspricht hier durchaus etwa der Summe der Einzelraten in Übereinstimmung mit den vorangehenden Resultaten anderer Autoren. Bei Anwendung der gleichen mutagenen Faktoren in umgekehrter Reihenfolge - also bei Röntgenbestrahlung mit nachfolgender chemischer Behandlung - ist das Resultat dagegen anders: hier entspricht der Kombinationseffekt einfach der Größe der jeweiligen Einzeleffekte; eine Additivität der mutagenen Wirkung fehlt.

Dieses unerwartete Resultat läßt sich vorerst nicht hinreichend erklären, auch eine besondere experimentelle Verursachung konnte nicht aufgedeckt werden. Ob es sich hier aber tatsächlich um einen Wirkungsantagonismus handeln könnte, bedarf der weiteren Abklärung.

Bislang kann demnach als berechtigt angenommen werden, daß bei der Auslösung von Punktmutationen (und auch von einfachen Chromosomenmutationen) verschiedene mutagene Faktoren einfach additiv wirken, wie es auch für Kombinationswirkungen von Röntgenstrahlen und cytostatischen Substanzen hinsichtlich somatischer Schädigungen zuzutreffen scheint. Dagegen sprechen die ersten Erfahrungen von OSTER über die Auslösung komplizierter Chromosomenmutationen (z. B. Translokationen) durch kombinierte Anwendung von Strahlen und chemischen Mutagenen dafür, daß hier mit einer synergistischen, wirkungssteigernden Beeinflussung der einzelnen Mutationsfaktoren zu rechnen ist, d. h. mit einer über eine einfache Summierung eindeutig hinausgehenden Mutationsbelastung.

Zusammenfassung

Bei der Taufliege Drosophila melanogaster wurde die mutationsauslösende Wirkung von 200 kV Röntgenstrahlen und von 2,5-Bisäthyleniminobenzochinon-1,4, einer neuen cytostatischen Substanz, einzeln und vor allem bei kombinierter Anwendung ermittelt. Zur Testung gelangten ausschließlich rezessiv-geschlechtsgebundene Letalfaktoren, die auf kreuzungsanalytischem Wege sicher mit der sog. MULLER-5-Methode erfaßbar sind.

Bei Einzelanwendung der obigen Noxen (Röntgenbestrahlung mit einer Dosis von 500 r bzw. intraabdominale Injektion einer subtoxischen Dosis von 2,5-Bisäthyleniminobenzochinon-1,4) ließ sich erwartungsgemäß eine eindeutige, etwa gleichgroße Steigerung der Mutationsrate auf 1,93 bzw. 2,43 % gegenüber der immer vorhandenen Spontanmutabilität (0,4 %) erzielen. Eine gleichartige kombinierte Anwendung der beiden mutagenen Noxen mit einem zeitlichen Intervall von 15 bis 20 Minuten führte bei Applikation in der Reihenfolge: chemisches Mutagen - Röntgenbestrahlung zu einer Mutationsrate, die ungefähr der Verdoppelung der jeweiligen Mutationsraten nach Einzelanwendung entspricht. Bei Einwirkung der Faktoren in der umgekehrten Reihenfolge fand sich dagegen keine Verdoppelung, sondern eine erheblich geringere Mutationsausbeute, etwa dem Einzeleffekt der Noxen entsprechend. Nur im ersteren Falle kann man berechtigt von einer Additivität der beiden mutagenen Wirkungen sprechen.

Literaturverzeichnis

AUERBA

AUERBACH, C. and J. M. ROBSON: The production of mutations by chemical substances. Proc. Roy. Soc. Edinb. 62, 284 (1945)

AUERBACH, Ch.: Chemical mutagenesis, Rev. Cambridge Phil. Soc. 24, 355 (1949)

AUERBACH, Ch.: Chemical mutagenesis. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 16, 199 (1951)

DOMAGK, G., S. PETERSEN u. W. GAUSS: Ein Beitrag zur experimentellen Chemotherapie der Geschwülste Z. Krebsforschung, 59, 617 (1955)

DRUCKREY, H., P. DANNENBERG u. D. SCHMÄHL: Zellteilungshemmende Gifte Arzneimittelforsch. 3, 151 (1953)

FEINE, U.: Radiomimetische Stoffe in SCHINZ, HOLTHUSEN u. a.: Strahlenbiologie, Strahlentherapie, Nuklearmedizin und Krebsforschung 1952 - 1958 S. 943 - 974, Thieme 1959

HADORN, E.: Letalfaktoren in ihrer Bedeutung für Erbpathologie und Genphysiologie der Entwicklung. Georg Thieme, Stuttgart 1955

HENKE, H., G. HÖHNE u. H. A. KÜNKEL: Untersuchungen über die mutagene Wirkung einiger Cytostatica. Ztschr. Krebsforsch. 62, 347 (1958)

HÖHNE, G., H. L. HEINRICH u. G. SCHUBERT: Über den Wirkungsmechanismus einiger cytostatischer Substanzen. Arch. Gynäk. 193, 207 (1958)

HOLZER, H., G. SEDLMAYR u. A. KEMNITZ: Zum Wirkungsmechanismus carcinostatischer Chemotherapeutica: Hemmung der Glykolyse durch Aethylenimin-Verbindungen. Biochem. Ztschr. 328, 163 (1956)

LÜERS, H.: Zur Frage der Erbschädigung durch tumortherapeutische Cytostatica. Ztschr. Krebsforsch. 60, 528 (1955)

LÜERS, H.: Chinon I und Sanamycin im Mutationsversuch Naturwiss. 43, 206 (1956)

MARQUARDT, H. u. G. SCHUBERT: Strahlengefährdung des Menschen durch Atomenergie. Rowohlts dtsch. Enzykl. 91 (1959)

MULLER, H. J.: Arteficial transmutations of the gene. Science 66, 84 (1927)

OEHLKERS, F.: Die Auslösung von Chromosomenmutationen in der Meiosis durch Einwirkung von Chemikalien. Ztschr. Vererbungslehre 81, 313 (1943)

OSTER, J. J.: Interactions between X-rays and chemical mutagens. Ztschr. Abstamm. u. Vererb. Lehre 89, 1 (1958)

SCHUBERT, G., C. BERTRAM u. G. HÖHNE: Genetische Schäden nach Einwirkung cytostatischer Substanzen Acta Union int. Cancr. 16, Nr. 3/4 (1960)

VOGT, M.: Analyse durch Äthylurethan bei Drosophila induzierter Mutationen. Ztschr. indukt. Abstamm. - u. Vererb. -Lehre 83, 332 (1950)

Für ihre freundliche Unterstützung danke ich
Herrn Dr. Höhne, Herrn Dr. Bertram und Fräulein Schade.

Lebenslauf

Ich, Gerhild Funke, geb. Kneschke, wurde am 9. 5. 35 in Meerane/Sachsen als Tochter des Hochschullehrers Prof. Dr. ing. Alfred Kneschke und seiner Ehefrau Ilse Kneschke, geb. Löbel, geboren.

Die Volksschule besuchte ich von 1941-1949 in Meerane, die Oberschule in Meerane, Jena/Thür. und zuletzt in Freiberg/Sa. 1953 bestand ich dort das Abitur mit "gut". Das Medizinstudium begann ich im gleichen Jahr in Jena. Zwei Semester nach dem Physikum wechselte ich für zwei weitere klinische Semester zur Humboldt-Universität Berlin über. Die letzten vier Semester absolvierte ich in Hamburg. Hier beendete ich mein Studium mit dem Staatsexamen, das ich mit "gut" bestand. Als Medizinalassistentin war ich zunächst in den Städtischen Krankenanstalten in Osnabrück tätig. Seit Dezember 1960 arbeite ich im Ev. Krankenhaus in Holzminden.